

P28509.P03

10/549816  
JC05 Rec'd PCT/PTO 19 SEP 2005

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Makoto ASASHIMA et al.

Mail Stop PCT

Appl. No. : Not Yet Assigned (National Phase of PCT/JP2004/003578)

I.A. Filed : March 17, 2004

For : ORGAN-FORMING METHOD


CLAIM OF PRIORITY

Commissioner for Patents  
U.S. Patent and Trademark Office  
Customer Service Window, Mail Stop PCT  
Randolph Building  
401 Dulany Street  
Alexandria, VA 22314

Sir:

Applicant hereby claims the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 and 365 based upon Japanese Application No. 2003-077123, filed March 20, 2003. The International Bureau already should have sent a certified copy of the Japanese application to the United States designated office. If the certified copy has not arrived, please contact the undersigned.

Respectfully submitted,  
Makoto ASASHIMA et al.

  
Bruce H. Bernstein  
Reg. No. 29,027  
Leslie J. Paperner  
Reg. No. 33,329

September 19, 2005  
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.  
1950 Roland Clarke Place  
Reston, VA 20191  
(703) 716-1191

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

17. 3. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 3 年   3 月 2 0 日  
Date of Application:

REC'D 29 APR 2004

WIPO

PCT

出 願 番 号            特 願 2 0 0 3 - 0 7 7 1 2 3  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 3 - 0 7 7 1 2 3 ]

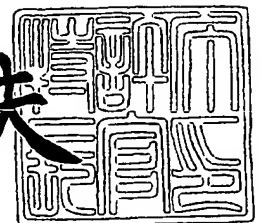
出   願   人            財 団 法 人 乙 卯 研 究 所  
Applicant(s):

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年   4 月 1 5 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 A31047M

【提出日】 平成15年 3月20日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都豊島区南大塚 3 - 4 0 - 9

    【氏名】 浅島 誠

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都杉並区阿佐ヶ谷北 3 - 1 2 - 2

    【氏名】 浜崎 辰夫

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都練馬区大泉町 2 - 3 9 - 6

    【氏名】 影近 弘之

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都杉並区下高井戸 5 - 9 - 1 8

    【氏名】 首藤 紘一

【特許出願人】

    【識別番号】 591063648

    【氏名又は名称】 財団法人乙卯研究所

【代理人】

    【識別番号】 110000109

    【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス

    【代表者】 今村 正純

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 170347

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

【物件名】

要約書 1

【プルーフの要否】

要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 器官形成方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 脊椎動物の未分化細胞から器官及び／又は組織をインビトロで形成する方法であって、脊椎動物の未分化細胞をレチノイン酸 X 受容体リガンドの存在下で培養する工程を含む方法。

【請求項 2】 レチノイン酸 X 受容体リガンドがレチノイン酸 X 受容体のアゴニスト又はアンタゴニストである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 レチノイン酸 X 受容体リガンドが下記の群：

4-[5H-2,3-(2,5-ジメチル-2,5-ヘキサノ)-5-メチルジベンゾ[b,e][1,4]ジアゼピン-11-イル]安息香酸、4-[2,3-(2,5-ジメチル-2,5-ヘキサノ)ジベンゾ[b,f][1,4]チアゼピン-11-イル]安息香酸、4-[2,3-(2,5-ジメチル-2,5-ヘキサノ)ジベンゾ[b,e]アゼピン-11-イル]安息香酸、4-[1,3-ジヒドロ-7,8-(2,5-ジメチル-2,5-ヘキサノ)-1-メチル-2-オキソ-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-5-イル]安息香酸、(Z)-5-[4-[N-メチル-(5,6,7,8-テトラヒドロ-5,5,8,8-テトラメチルナフタレン-2-イル)カルボキサミド]ベンジリデン]-2,4-チアゾリジンジオン、(Z)-5-[4-[N-メチル-N-(5,6,7,8-テトラヒドロ-3,5,5,8,8-ペンタメチルナフタレン-2-イル)アミノ]ベンジリデン]-2,4-チアゾリジンジオン、4-[N-シクロプロピルメチル-N-(5,6,7,8-テトラヒドロ-3,5,5,8,8-ペンタメチルナフタレン-2-イル)アミノ]安息香酸、2-[N-シクロプロピルメチル-N-(5,6,7,8-テトラヒドロ-5,5,8,8-テトラメチルナフタレン-2-イル)アミノ]ピリミジン-5-カルボン酸、4-[1-(5,6,7,8-テトラヒドロ-5,5,8,8-テトラメチルナフタレン-2-イル)-1,3-ジオキサラン-1-イル]安息香酸、4-[1-(5,6,7,8-テトラヒドロ-3,5,5,8,8-ペンタメチルナフタレン-2-イル)エテン-1-イル]安息香酸、6-[1-(5,6,7,8-テトラヒドロ-3,5,5,8,8-ペンタメチルナフタレン-2-イル)シクロプロプ-1-イル]ピリジン-3-カルボン酸、4-(5H-2,3-(2,5-ジメチル-2,5-ヘキサノ)-5-メチル-8-ニトロジベンゾ[b,e][1,4]ジアゼピン-11-イル)安息香酸、4-[5H-2,3-(2,5-ジメチル-2,5-ヘキサノ)-5-n-プロピルジベンゾ[b,e][1,4]ジアゼピン-11-イル]安息香酸、4-(5H-10,11-ジヒドロ-2,3-(2,5-ジメチル-2,5-ヘキサノ)-5,10-ジメチル-8-フェニル-ジベンゾ[b,e][1,4]

ジアゼピン-11-イル)安息香酸、2-[N-(3-n-ヘキシルオキシ-5,6,7,8-テトラヒドロ-5,5,8,8-テトラメチルナフタレン-2-イル)-N-メチルアミノ]ピリミジン-5-カルボン酸、5-[4-(5,6,7,8-テトラヒドロ-5,5,8,8-テトラメチルナフタレン-2-yl)フェニル]トロポロン、(2E,4E,6Z)-3-メチル-7-(5,6,7,8-テトラヒドロ-5,5,8,8-テトラメチル-3-n-プロピルオキシナフタレン-2-イル)オクタ-2,4,6-トリエン酸(LG100754)、及び4-[N-[3-(2-エチル-o-カルボラン-1-イル)フェニル]-N-メチルアミノ]安息香酸からなる群から選ばれる請求項2に記載の方法。

【請求項4】 形成される器官及び／又は組織が心臓、平滑筋組織、又は脂肪細胞組織である請求項1ないし3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】 請求項1ないし4のいずれか1項に記載の方法により形成された器官及び／又は組織。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は脊椎動物の未分化細胞から器官を形成する方法に関する。

##### 【0002】

#### 【従来の技術】

ヒトを含めて脊椎動物の生体には非常に沢山の器官や組織が存在しているが、それらはもともと1個の受精卵から細胞分裂(卵割)と細胞分化を経て形成され、バランスのとれた体制をもつ個体を構成するようになる。このような器官及び組織形成のプロセスはきわめて複雑であり、誘導現象と呼ばれる重要な細胞間の相互作用が多段階にわたって行われていると考えられている。

##### 【0003】

生体内で行われる器官形成のプロセスを試験管内(イン・ビトロ)で再現し、未分化細胞から所望の器官を形成する試みがなされている(例えば、「未分化細胞からの臓器形成」、炎症・再生、Vol.22, 21, 2002、脾臓の器官形成については特開2001-299335号公報及び特開2001-333770号公報を参照のこと)。例えば、イモリの胞胚期のアニマルキャップ(多能性をもった細胞塊)である未分化細胞を高濃度のアクチビンで処理するとリズミカルに拍動する心臓を60%の形成率で形

成することができる。この心臓は、1ヶ月以上も正常な拍動数を維持することができ、心筋細胞に特異的な遺伝子の発現や心筋に特異的な介在板の存在なども確認できることから、機能的及び構造的にはほぼ完全な心臓であると言える。

#### 【0004】

一方、レチノイン酸（ビタミンA酸）はビタミンAの活性代謝産物であり、発生途上にある未熟な細胞を特有な機能を有する成熟細胞へと分化させる作用や、細胞の増殖促進作用や生命維持作用などの極めて重要な生理作用を有している。これまでに合成された種々のビタミンA誘導体、例えば、特開昭61-22047号公報や特開昭61-76440号公報記載の安息香酸誘導体、及びジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー（Journal of Medicinal Chemistry, 1988, Vol. 31, No. 1, p.2182）に記載の化合物なども、同様な生理作用を有することが明らかにされている。レチノイン酸及びレチノイン酸様の生物活性を有する上記化合物は「レチノイド」と総称されている。

#### 【0005】

レチノイン酸は前後軸に沿った胚のパターンニングに対する調節因子であり（Nature 340, 140-144, 1989、Development 112, 945-958, 1991、Dev. Biol. 192, 1-16, 1997、Zool. Sci. 15, 879-886, 1998）、このレチノイン酸がツメガエル胚における前方神経組織を後方化させ、中胚葉の発達において影響を及ぼすことが知られている（Genes Dev. 5, 175-187, 1991、Develop. Growth. Differ. 35, 123-128, 1993）。また、ツメガエルアニマルキャップ細胞にアクチビンの投与量を変化させて処理することにより脊索、筋肉、間充織及び体腔上皮のようなほとんどの中胚葉組織を誘導することができること（Roux's Arch. Dev. Biol. 198, 330-335, 1990、Nature 347, 391-394, 1990、Roux's Arch. Dev. Biol. 200, 230-233, 1991）、及びアクチビンと共処理するレチノイン酸の投与量を変化させることにより、アニマルキャップ細胞から分化する脊索、筋肉及び前腎のような中胚葉組織を側後方化させること（Develop. Growth. Differ. 35, 123-128, 1993）が報告されている。

#### 【0006】

内胚葉性器官に対するレチノイン酸の作用については、発生段階22～32のツメガ

エル胚をレチノイン酸で処理すると、腸、肝臓、胃などの消化器官の形態が異常になると、Dixonらにより報告されているが、レチノイン酸で処理した発生段階22~32のツメガエル胚の脾臓は正常に形成され、内胚葉特異的マーカーであるXlHbox8の発現にも影響がみられないことも報告されている (Dev. Genes Evol. 208, 318-326, 1998)。

#### 【0007】

また、オール・トランス(all-trans)・レチノイン酸は、細胞核内に存在する核内レセプター・スーパーファミリー (Evans, R.M., Science, 240, p.889, 1988) に属するレチノイン酸レセプター (RAR) にリガンドとして結合して、動物細胞の増殖・分化あるいは細胞死などを制御することが明らかにされている (Petkovich, M., et al., Nature, 330, pp.444-450, 1987)。このオール・トランス・レチノイン酸を用いて、あるいはオール・トランス・レチノイン酸とアクチビンを組み合わせて用いることによって脾臓をインビトロで形成できることが知られている (特開2001-299335号公報及び特開2001-333770号公報)。

#### 【0008】

レチノイン酸の生理活性の発現については、レチノイドXレセプター (RXR, 9-cis-レチノイン酸を天然リガンドとする：本化合物はRARのリガンドでもある) の存在が証明されている。RXRはRARと二量体を形成し、遺伝子の転写を惹起ないし抑制してレチノイン酸の生理活性の発現を調節していることが明らかにされている (Mangelsdorf, D.J. et al., Nature, 345, pp.224-229)。RXRに結合可能なアゴニスト又はアンタゴニストが種々知られているが (アゴニストとしては、例えば特開平10-59951号公報に記載されたHX600など、アンタゴニストとしては同公報に記載されたHX603など)、RXRに結合するリガンドを用いて未分化細胞から器官を形成できるか否かは従来全く知られていない。

#### 【0009】

【発明が解決しようとする課題及び課題を解決するための手段】

本発明の課題は、脊椎動物の未分化細胞から所望の器官を形成する手段を提供することにある。本発明者らは、上記の課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、RXRに結合するリガンドを用いて未分化細胞から心臓や神経などの器官を形成で



きることを見出した。本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。

#### 【0010】

すなわち、本発明により、脊椎動物の未分化細胞から器官及び／又は組織をインビトロで形成する方法であって、脊椎動物の未分化細胞をレチノイン酸X受容体リガンドの存在下で培養する工程を含む方法が提供される。この発明の好ましい態様によれば、レチノイン酸X受容体リガンドがレチノイン酸X受容体のアゴニスト又はアンタゴニストである上記の方法、形成される器官及び／又は組織が心臓、平滑筋組織、又は脂肪細胞組織である上記の方法が提供される。また、別の観点からは、本発明により、上記の方法で形成された器官及び／又は組織が提供される。

#### 【0011】

##### 【発明の実施の形態】

本明細書において「器官及び／又は組織」とは、脊椎動物を構成する器官、組織、及びそれらの結合物を意味している。例えば、本発明の方法により形成される器官には、通常は組織として分類される構造物が結合している場合もあるが、そのような結合物を形成する方法も本発明の範囲に包含される。また、本発明の方法により同時に形成される器官及び組織はそれぞれ2種以上であってもよい。器官としては、例えば心臓、脾臓、腎臓などを例示することができ、組織としては神経組織、平滑筋組織、脂肪細胞組織などを例示することができるが、これらに限定されることはない。器官としては心臓などが好ましく、組織としては平滑筋組織又は脂肪組織などが好ましい。

#### 【0012】

レチノイン酸X受容体リガンドには、レチノイン酸X受容体のアゴニスト及びアンタゴニストが包含される。ある物質がレチノイン酸X受容体のリガンドとなるか否かは、例えばBoehm, M. F., et al., J. Med. Chem., 37(18), 2930-2941, 1994; Heyman, R. A., et al., Cell, 68(2), 397-406, 1992; Levin, A. A., et al., Nature, 355(6358), 359-361, 1992; Chen, J. Y., et al., Nature, 382, 819-822, 1996などに記載された方法により当業者が容易に確認することができる。レチノイン酸X受容体リガンドとしては、例えば、特開平9-100270号

公報、特開平10-59951号公報、特開平10-114757号公報、特開平10-237050号公報、特開平10-338658号公報、特開2000-273079号公報、国際公開W0 99/24415などに記載された化合物のうちレチノイン酸X受容体リガンドとして作用可能な化合物を用いることができるが、これらに限定されることはない。RXRリガンドは2種以上を組み合わせる用いてもよい。RXRアゴニストとRXRアンタゴニストを組み合わせる用いることも可能である。

### 【0013】

より具体的には、RXR アゴニストとしては、例えば、

4-[5H-2,3-(2,5-ジメチル-2,5-ヘキサノ)-5-メチルジベンゾ[b,e][1,4]ジアゼピン-11-イル]安息香酸(HX600)；

4-[2,3-(2,5-ジメチル-2,5-ヘキサノ)ジベンゾ[b,f][1,4]チアゼピン-11-イル]安息香酸(HX630)；

4-[2,3-(2,5-ジメチ-2,5-ヘキサノ)ジベンゾ[b,e]アゼピン-11-イル]安息香酸(HX640)；

4-[1,3-ジヒドロ-7,8-(2,5-ジメチル-2,5-ヘキサノ)-1-メチル-2-オキソ-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-5-イル]安息香酸(HX801)；

(Z)-5-[4-[N-メチル-(5,6,7,8-テトラヒドロ-5,5,8,8-テトラメチルナフタレン-2-イル)カルボキサミド]ベンジリデン]-2,4-チアゾリジンジオン(TZ191)；

(Z)-5-[4-[N-メチル-N-(5,6,7,8-テトラヒドロ-3,5,5,8,8-ペンタメチルナフタレン-2-イル)アミノ]ベンジリデン]-2,4-チアゾリジンジオン(TZ335)；

4-[N-シクロプロピルメチル-N-(5,6,7,8-テトラヒドロ-3,5,5,8,8-ペンタメチルナフタレン-2-イル)アミノ]安息香酸(DA124)；

2-[N-シクロプロピルメチル-N-(5,6,7,8-テトラヒドロ-5,5,8,8-テトラメチルナフタレン-2-イル)アミノ]ピリミジン-5-カルボン酸(PA024)；

4-[1-(5,6,7,8-テトラヒドロ-5,5,8,8-テトラメチルナフタレン-2-イル)-1,3-ジオキソラン-1-イル]安息香酸(SR11237)；

4-[1-(5,6,7,8-テトラヒドロ-3,5,5,8,8-ペンタメチルナフタレン-2-イル)エテン-1-イル]安息香酸(LGD1069)；及び

6-[1-(5,6,7,8-テトラヒドロ-3,5,5,8,8-ペンタメチルナフタレン-2-イル)シク

ロプロブ-1-イル]ピリジン-3-カルボン酸(LG268)などを挙げることができる。

#### 【0014】

RXRアンタゴニストとしては、

4-(5H-2,3-(2,5-ジメチル-2,5-ヘキサノ)-5-メチル-8-ニトロジベンゾ[b,e][1,4]ジアゼピン-11-イル)安息香酸(HX531)；

4-[5H-2,3-(2,5-ジメチル-2,5-ヘキサノ)-5-n-プロピルジベンゾ[b,e][1,4]ジアゼピン-11-イル]安息香酸(HX603)；

4-(5H-10,11-ジヒドロ-2,3-(2,5-ジメチル-2,5-ヘキサノ)-5,10-ジメチル-8-フェニル-ジベンゾ[b,e][1,4]ジアゼピン-11-イル)安息香酸(HX711)；

2-[N-(3-n-ヘキシルオキシ-5,6,7,8-テトラヒドロ-5,5,8,8-テトラメチルナフタレン-2-イル)-N-メチルアミノ]ピリミジン-5-カルボン酸(PA452)；

5-[4-(5,6,7,8-テトラヒドロ-5,5,8,8-テトラメチルナフタレン-2-yl)フェニル]トロポロン(Tp180)；

(2E,4E,6Z)-3-メチル-7-(5,6,7,8-テトラヒドロ-5,5,8,8-テトラメチル-3-n-プロピルオキシナフタレン-2-イル)オクタ-2,4,6-トリエン酸(LG100754)；及び

4-[N-[3-(2-エチル-o-カルボラン-1-イル)フェニル]-N-メチルアミノ]安息香酸などが挙げられる。もっとも、RXRアゴニスト及びRXRアンタゴニストはこれらの特定の化合物に限定されることはない。

#### 【0015】

本発明の方法に使用可能な脊椎動物の未分化細胞の種類は特に限定されないが、例えば、哺乳類動物のほか、鳥類、は虫類、両生類などの脊椎動物の未分化細胞を用いることができる。未分化細胞としては、胚性幹細胞、造血幹細胞、小腸クリプトの基底細胞などの幹細胞のほか、例えば中～後期の胞胚のアニマルキャップや胚様体(embryoid body)などの細胞集団を用いることもできる。本明細書において用いられる「未分化細胞」の用語は、2以上の細胞により形成される細胞集団や細胞塊を排除するものと解釈してはならない。

#### 【0016】

本発明の方法による器官及び／又は組織形成は、未分化細胞からの器官及び／又は組織形成方法として当業界で利用されている種々の方法で行うことができる。

例えば、未分化細胞から臍臓を形成する方法について特開2001-299335号公報及び特開2001-333770号公報に詳細に記載されているので、当業者はこれらの刊行物を参照しつつ、本明細書の実施例の方法に従って、未分化細胞から所望の器官を形成させることができる。特開2001-299335号公報及び特開2001-333770号公報の開示のすべてを参照として本明細書の開示に含める。

#### 【0017】

例えば、胚性幹細胞から誘導した胚様体を用いて、適宜の濃度のRXRリガンドの存在下で1ないし数日培養することにより器官形成を行うことができる。RXRリガンドの存在下で1ないし数日培養した後、RXRリガンドの非存在下でさらに培養を継続してもよい。RXRリガンドの濃度は特に限定されないが、例えば $1 \times 10^{-12}$ ～ $1 \times 10^{-3}$ M程度の範囲から適宜選択できる。本発明の方法はイン・ビトロの環境下で行うことができるが、本明細書においてイン・ビトロの用語は「生体外」の意味で用いられており、いかなる意味においても限定的に解釈してはならない。

#### 【0018】

例えば、胚性幹細胞（ES細胞）としては、Hooperによって樹立された129系マウスのE14細胞(ATCC #; CRL-1821)又はLedermann and Burkiによって樹立されたC57BL系マウスのB6(ATCC #; SCRC-1002)などを用いることができる。これらはマウス胚盤胞の内部細胞塊からライン化されたものである。もっとも、胚性幹細胞の種類はこれらに限定されることはない。なお、通常の場合、胚性幹細胞の継代数は器官及び／又は組織形成能に影響を及ぼさない。

#### 【0019】

例えば、胚性幹細胞から誘導した胚様体をゼラチンコートした培養皿に接着させた後、RXRリガンドの溶液を必要に応じて培地で希釈して培地に加えて1から数日処理する。RXRリガンドを溶解するための溶媒としては、水、生理食塩水、緩衝液などのほか、ジメチルスルホキシドなどの有機溶媒又は水と有機溶媒との混合物を用いることもできる。胚様体の培養には、必要に応じてラミニン、コラーゲンIやマトリゲルコート(Biocoat, Becton Dickinson 社製)したマルチウェルプレートを用いることもできる。この処理後、一定時間後の細胞分化状態を記

録することが望ましい。上記の処理の前後に、骨形成因子 (Bone morphogenic protein, BMP) である BMP2/4 や BMP6/7 のほか、FGF、アクチビン、フォリスタチン、ビデロゲニン、インスリン、グルカゴン、コンカナバリン、サイトカラシン、カドベリンなどの誘導因子、細胞増殖因子、又はサイトカイン類などを用いて処理することもできる。このような処理を採用することにより、器官及び／又は組織形成の方向性や形成率を高めることができる場合がある。

#### 【0020】

本発明の方法により形成された器官及び／又は組織は、その器官及び／又は組織を直接又は間接の作用点とする医薬のスクリーニングに用いることができる。例えば、本発明の方法により心臓を形成させた場合、形成された心臓は長期に渡って一定の拍動リズムを有するが、例えばこの心臓を用いて心拍数の増減に作用する医薬をスクリーニングすることが可能である。

#### 【0021】

##### 【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

##### 例 1：心臓の形成

ES細胞として29系マウスのE14細胞(ATCC #; CRL-1821)又はC57BL系マウスのB6(ATCC #; SCRC-1002)を用いた。0.1%のゼラチンでコートした培養皿に13日胚のマウスから作成したマウス胎児繊維芽細胞を播種し、12%牛胎児血清(Giboco)、100 U/ml ペニシリン(Sigma)、100 µg/ml ストレプトマイシン(Sigma)を含む培地で24時間培養した。この細胞を10 µg/ml のマイトマイシンC(MMC; Sigma)で4時間処理し細胞分裂を阻害した後、リン酸緩衝生理食塩水(Phosphate buffered saline, PBS)で2回洗浄してMMCを取り除いた。この繊維芽細胞(フィーダー)の上にES細胞を播種した。ES細胞用培地としては、15% ES用牛胎児血清(Giboco)、2 mM L-グルタミン(Gibco)、MEM non-essential amino acid (Sigma)、1 mM ピルビン酸ナトリウム(Giboco)、0.0007% β-メルカプトエタノール(Sigma)、1000 U/ml Leukemia inhibiting factor (Chemicon)、100 U/ml ペニシリン(Sigma)、100 µg/ml ストレプトマイシン(Sigma)を含むD-MEM(高グルコース

, Giboco)を用い、CO<sub>2</sub>インキュベーター (5% CO<sub>2</sub>、100% 湿度) で37°Cで培養し、培地交換は毎日行った。

#### 【0022】

継代培養は、ES細胞を播種してから72時間後に行った。ゼラチンコートした培養皿に、MMC処理したフィーダー細胞 (マウス胎児繊維芽細胞) を24時間前に播種しておき、この上に0.05% トリプシン-0.02% EDTA処理によって完全に解離したES細胞を播種し、コロニーを形成させた (図1参照)。ES細胞を播種してから3日間培養してコロニーを形成させ、このコロニーをピペッティングによって単離した後、細胞接着性の非常に弱いバクテリア用培養皿に播種した。培地としては15% Knockout SR (KSR, Giboco), 100 U/ml ペニシリン, 100 µg/ml ストレプトマイシンを含むD-MEM (高グルコース)を用いた。この状態でさらに3日間培養することにより胚様体を作成した (図2)。

#### 【0023】

この胚様体を0.1% のゼラチンコートした24ウェルプレート (TPP社製) に4~6個づつ播種し、RXRリガンドとして $1 \times 10^{-5}$  MのPA024 (2-[N-シクロプロピルメチル-N-(5,6,7,8-テトラヒドロ-5,5,8,8-テトラメチルナフタレン-2-イル)アミノ]ピリミジン-5-カルボン酸) を添加して2日間培養した。処理開始時を0時間として48~72時間後に自律的に拍動する心筋様細胞の細胞塊が形成された (図3)。この細胞塊の出現頻度は、0.2細胞塊/胚様体であり、未処理群又は $1 \times 10^{-5}$  Mオールトランスレチノイン酸で処理した対照群では、処理後2週間以内ではほとんど心筋様細胞の分化は認められないため、有意にPA024が作用していると考えられた。一方、 $2 \times 10^{-6}$  MのPA024で処理した胚様体では、出現時期は遅れるものの心筋様細胞塊の出現頻度が高く、72~96 時間で0.5 細胞塊/胚様体の形成が認められた。これらの細胞塊は、骨格筋様細胞のように繊維状構造を取らず、細胞塊を形成して自立的拍動を続けた。

#### 【0024】

例2: 平滑筋及び脂肪細胞の形成

例1と同様にして $1 \times 10^{-5}$ ~ $2 \times 10^{-6}$  M のPA024で処理後、培養をさらに続けると約1~2週間で平滑筋様細胞が形成された。この細胞塊は、ゆっくりとしたぜん動

運動を示した。頻度は0.1～0.2 細胞塊／胚様体であった（図4）。また、2週間程度で脂肪細胞が出現し始め、20日間培養し続けると全体の30～40%程度が脂肪細胞となった。胚様体あたりの数値に換算するとほぼ100%であった。対照群（ $1 \times 10^{-5}$  Mのオールトランスレチノイン酸処理）と比較してPA024処理群では形成された脂肪細胞の量は2～3倍多かった（図5）。

【図面の簡単な説明】

【図1】 ES細胞のコロニーを示した写真である。

【図2】 バクテリアディッシュで形成された胚様体を示した写真である。

【図3】 本発明の方法で形成された心臓（心筋様細胞塊）を示した写真である。

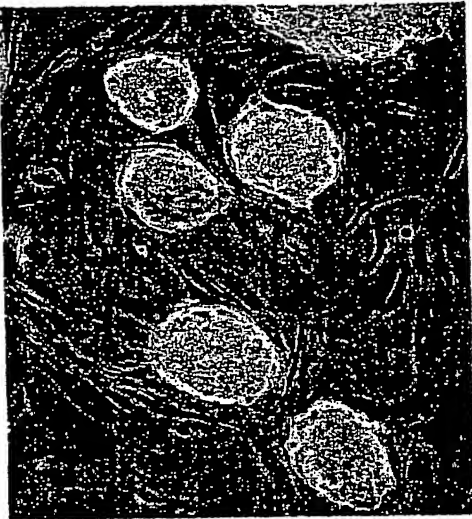
。

【図4】 本発明の方法で形成された平滑筋組織（平滑筋様細胞塊）を示した写真である。

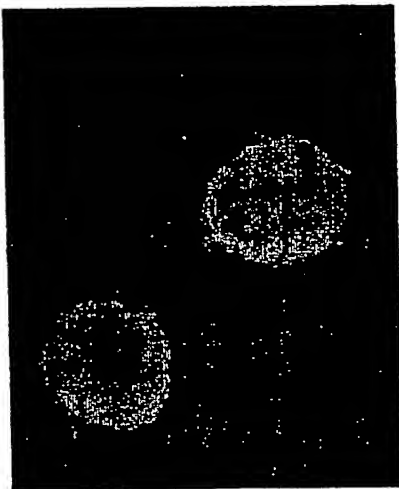
【図5】 本発明の方法で形成された脂肪細胞組織を示した写真である。

【書類名】 図面

【図 1】



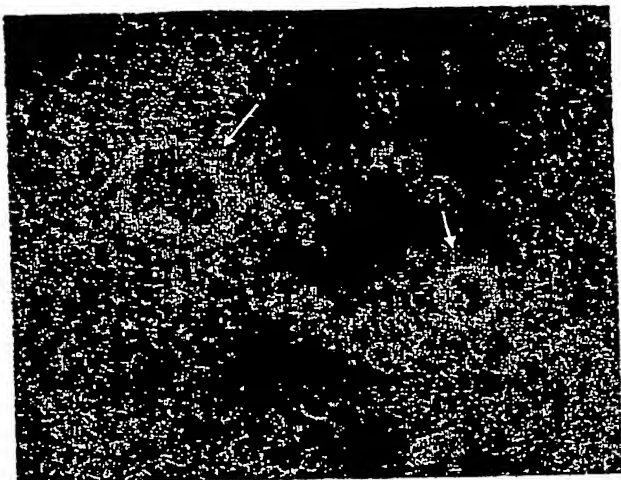
【図 2】



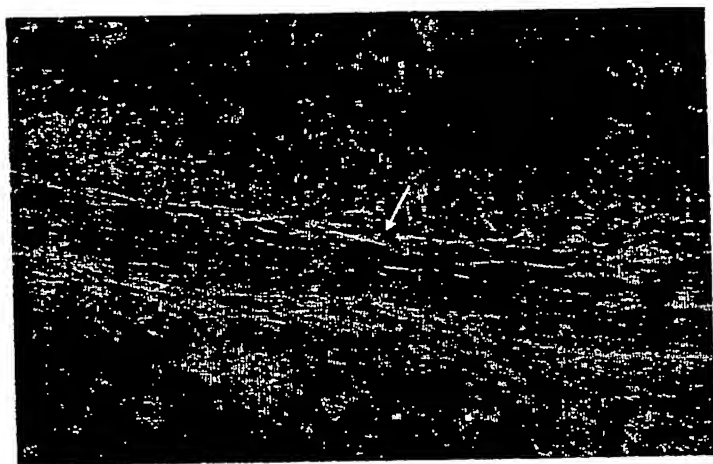
BEST AVAILABLE COPY



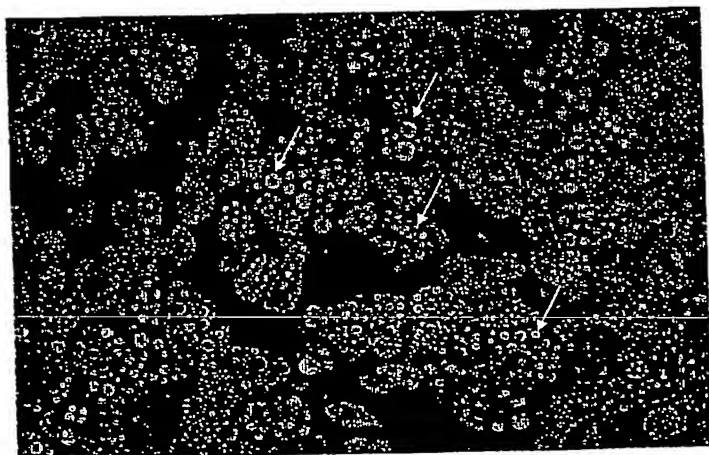
【図 3】



【図 4】



【図 5】



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 脊椎動物の未分化細胞から心臓や脂肪組織などの器官又は組織を形成する方法を提供する。

【解決手段】 脊椎動物の未分化細胞から器官及び／又は組織をインビトロで形成する方法であって、脊椎動物の未分化細胞をレチノイン酸X受容体リガンド（例えば2-[N-シクロプロピルメチル-N-(5,6,7,8-テトラヒドロ-5,5,8,8-テトラメチルナフタレン-2-イル)アミノ]ピリミジン-5-カルボン酸など）の存在下で培養する工程を含む方法。

【選択図】 なし

特願 2003-077123

出願人履歴情報

識別番号

[591063648]

1. 変更年月日

1991年 3月29日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都世田谷区玉川2丁目28番10号

氏 名

財団法人乙卯研究所